



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESIS

ESTUDIO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DE UN HUESO LIOFILIZADO FABRICADO EN CHILE Y DE UN HUESO COMERCIAL (BIO-OSS)

*(TESIS ADJUNTA AL PROYECTO **PRI-ODO 07/02**: EVALUACION MORFOLÓGICA Y DE
BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA DE FABRICACIÓN
CHILENA.)*

JAVIER ARAYA HERNANDEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA.

TUTOR PRINCIPAL
PROF. DR. MARIA ANGELICA TORRES V.

TUTOR ASOCIADO
DR. NELSON BRIERLEY C
DR. JORGE CABELLO A.

SANTIAGO – CHILE

2006

A mi familia quienes son el pilar fundamental

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Angélica Torres, profesora del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por su inagotable paciencia y entrega.

Al Dr. Nelson Brierley, instructor del Departamento de Prótesis, Área Prótesis Fija, por darme la primera idea para este trabajo..

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO.....	8
ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN OSEA	8
ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL HUESO	8
MATRIZ DEL TEJIDO ÓSEO	11
CÉLULAS OSEAS	14
DESARROLLO Y CRECIMIENTO ÓSEO.....	20
CRECIMIENTO Y REMODELADO DEL HUESO CORTICAL	21
FORMACIÓN Y REMODELACIÓN DEL HUESO ESPONJOSO.....	23
REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO	24
BIOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	25
ACTIVACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA	25
PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA	26
TÉCNICAS DE REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIAL Y MÉTODO	37
OBTENCIÓN DEL HUESO LIOFILIZADO CHILENO.....	37
ANÁLISIS DE DENSIDAD DEL HUESO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y HUESO COMERCIAL BIO-OSS®.....	38
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	39

RESULTADOS	41
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y VOLUMÉTRICA DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y DE BIO-OSS	41
CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y BIO-OSS.....	46
ANÁLISIS DE LA POROSIDAD RELATIVA PRESENTADA POR LAS PARTÍCULAS DE CADA MUESTRA DE HUESO CCHEN Y BIO-OSS.....	48
COMPARACIÓN MORFOLÓGICA, DE TAMAÑO Y DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN CON LAS DEL BIO-OSS®	48
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	54
RESUMEN	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	56

INTRODUCCIÓN

Con el advenimiento de la implantología, la odontología ha debido enfrentarse nuevamente a la problemática de la reabsorción ósea post extracción y a la consecuente falta de hueso para la colocación de implantes oseointegrados. Para solucionar este problema la odontología ha ido creando diversas técnicas y materiales. Entre los más frecuentes se encuentran los injertos óseos, los cuales pueden ser autógenos, alógenos, aloplásticos y xenoinjertos.

Los xenoinjertos son los más utilizados en la actualidad, especialmente el Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland), que es hueso bovino desproteínizado que actúa como soporte para la formación ósea y se dice que posee propiedades osteoconductoras. En diversos estudios ha mostrado conducir un crecimiento propicio de hueso nuevo y también ha sido usado satisfactoriamente en regeneración de defectos, aumento de reborde y elevación del piso sinusal.

Bio-Oss® es obtenido de huesos de bovinos, los cuales en algunos países desde hace unos años sufren de la Encefalopatía Bovina Espongiforme o Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, que se caracteriza por producir la degeneración del sistema nervioso central de manera irreversible por muerte neuronal. La enfermedad es causada por un ente transmisible no convencional que es una proteína infecciosa denominada Prión, cuya única forma de destruir es mediante incineración. Por tal motivo es necesario buscar ganado que este a salvo de esta enfermedad, como es el caso de la población bovina de Chile. La Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) se ha preocupado de preparar un hueso desproteínizado a partir de animales chilenos, donde no se han reportado casos de dicha patología (1), permitiendo así la

obtención de un producto de uso seguro para cirugías que requieran de injerto, con una producción nacional. Esto permite además una reducción de los costos del material haciendo más accesible a la población este tipo de terapias regenerativas.

El objetivo del presente estudio es caracterizar morfológicamente el hueso desarrollado por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) y compararlo con un xenoinjerto comercial de uso internacional (Bio-Oss®). El conocimiento de las propiedades de tamaño de partícula y nivel de porosidad que el protocolo de preparación permite para este hueso bovino permitirán conocer mejor el producto y sus posibles interacciones con el hueso del futuro huésped.

Antes de mostrar los resultados obtenidos en este estudio, se presentará una revisión bibliográfica acerca de Regeneración Ósea Guiada, donde analizaremos la estructura y la composición del hueso, su crecimiento y desarrollo, la biología de la regeneración ósea y su promoción.

MARCO TEÓRICO

ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN ÓSEA

ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL HUESO

Macroscópicamente los huesos largos se dividen en epífisis, metáfisis y diáfisis. La epífisis y la metáfisis están constituidas por una capa de hueso compacto cortical que rodea un cuerpo trabecular de hueso esponjoso. En la diáfisis, el hueso cortical se adelgaza y las trabéculas son reemplazadas por una cavidad medular. En los huesos cortos (vértebras, huesos del carpo y del tarso) no existe diáfisis y la metáfisis se incorpora a la epífisis. Las costillas y la mandíbula consisten en hueso esponjoso rodeado por una capa cortical. (Ver Fig. 1a).

La estructura ósea está cubierta por el periostio en su exterior y por el endostio en su superficie interna. Estas capas presentan canales vasculares que penetran en el hueso compacto desarrollando en su interior una tercera capa denominada complejo haversiano o endocortical. Estas tres capas son importantes en dos aspectos; el potencial osteogénico y la abundante vascularización, lo que permite que participen en las actividades de modelado y remodelado y en la reparación ósea.

El periostio cubre toda la superficie externa de los huesos excepto las superficies articulares y las inserciones de ligamentos. Su estructura bifásica varía desde un tejido conectivo laxo con fibras paralelas hasta una membrana fibrosa densa en su fase externa. Las células osteoprogenitoras están comúnmente localizadas en la vecindad de los vasos sanguíneos próximos a la superficie ósea en la fase interna del periostio. Las células del

endostio pertenecen al estroma de la medula ósea o son derivadas de osteoblastos en reposo, los cuales constituyen la principal fuente de las células que recubren los canales corticales.

Microscópicamente y según la orientación de las fibras de colágeno, encontramos tres tipos de hueso: el hueso reticular, lamelar o lamelillar y compuesto.

El hueso reticular es aquel en que las fibras de colágeno tienen una distribución desorganizada. Es un hueso de rápida formación, que se encuentra principalmente durante el crecimiento embrionario y en niños pequeños, donde es paulatinamente reemplazado por hueso lamelar. En adultos lo podemos encontrar durante procesos reparativos y en algunas condiciones patológicas como el síndrome de Paget, hiperparatiroidismo o fluorosis. Se caracteriza también por presentar mayor número de osteocitos alargados y bajo contenido mineral (Ver Fig. 1b). El hueso lamelar es caracterizado por fibras paralelas de colágeno de entre 3 y 5 μm de espesor, las cuales cambian su orientación de lamela a lamela. (Ver Fig. 1c).

El hueso compuesto tiene las propiedades fisiológicas del hueso reticular. Este se forma en las etapas tempranas de la formación ósea y durante la aposición endostal y periostal de hueso. Las fibras colágenas corren paralelas a la superficie pero no están organizadas como en el hueso lamelar.

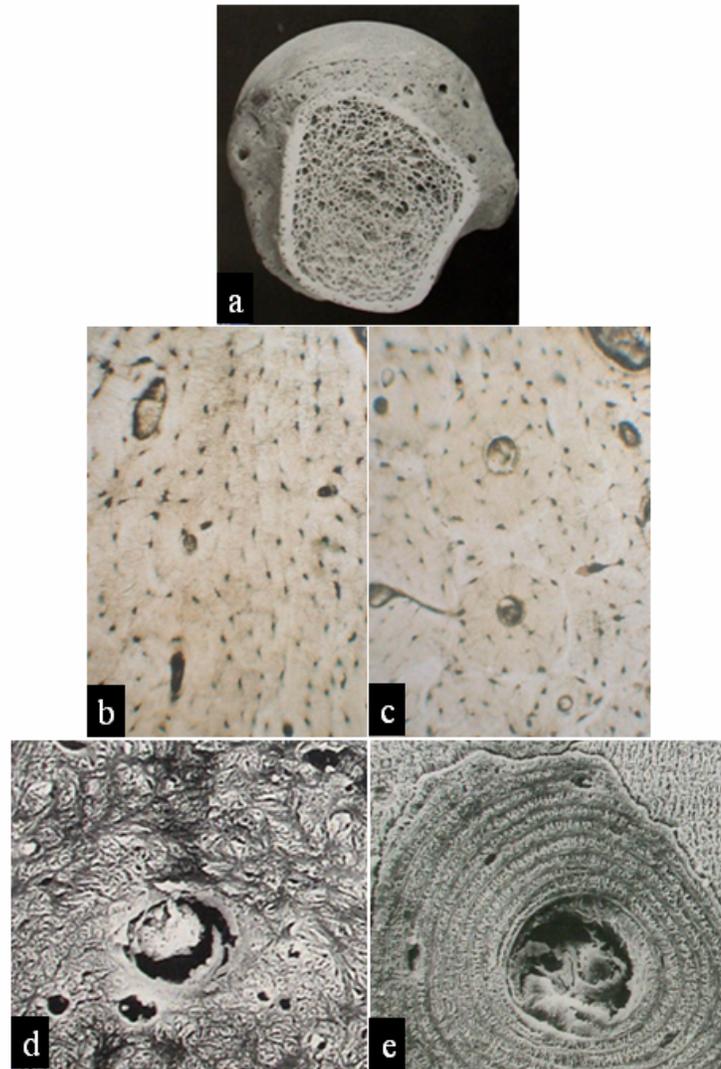


Fig. 1: **a:** Sección transversal de húmero **b:** Hueso reticular visto en microscopio óptico **c:** Hueso lamelar visto en microscopio óptico **d:** Osteón primario visto bajo M.E.B. **e:** Osteón secundario visto bajo M.E.B. Fotos tomadas de referencia N°2

Según la orientación de las lamelas el hueso cortical presenta en su matriz diferentes compartimentos. La unidad estructural básica son los osteones (Ver Fig. 1d), estructuras cilíndricas que se orientan longitudinalmente alrededor de un canal vascular (haversiano). Los osteones pueden ser del tipo secundario, en el cual sus paredes están compuestas por lamelas

concéntricas y del tipo primario que se caracterizan por presentar una matriz de hueso compuesto más primitivo (Ver Fig. 1 e). Entre los osteones existen lamelas intersticiales las cuales son remanentes de osteones formados en estadios más tempranos o producto de actividades de remodelación, en los cuales el canal haversiano se ha obliterado y los osteocitos atrapados en las lagunas se necrosan por la falta de suplemento sanguíneo. También esta matriz desvitalizada se transforma más tarde en una del tipo altamente mineralizada.

Las trabéculas del hueso esponjoso se proyectan desde la superficie interna del hueso compacto hacia la cavidad medular, no conteniendo la mayoría de las veces, osteones. Las trabéculas tienen sólo una pequeña cantidad de células y lamelas irregularmente dispuestas, éstas contienen lagunas con osteocitos que a través de sus canalículos se conectan con la médula.

Estructuralmente el hueso se constituye de una matriz donde se encuentran una serie de células que se ubican tanto en profundidad como en las superficies del hueso. La matriz está generalmente mineralizada por lo que se habla de un componente inorgánico y de un componente orgánico:

MATRIZ DEL TEJIDO ÓSEO

El hueso consiste en un 65% de mineral, principalmente hidroxapatita, un 25% de matriz orgánica y un 10% de agua. El 90% de la fase orgánica está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas (3). Contiene

característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea (4). Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

El restante 10 % de la fase orgánica está compuesto por proteínas no colágenas, entre las que destacan:

- **Proteoglicanos:** Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: Hialuronano y Condroitín-sulfato: de molécula grande, intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Biglicano y decorina: de molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.
- **Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico:** Son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.
- **Glicoproteínas:** Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp).

La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal.

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica.

Proteínas con el tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha v\beta 3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

- ***Proteínas procedentes del plasma:*** Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la $\alpha 2$ -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
- ***Factores de Crecimiento:*** Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina (5).

CELULAS ÓSEAS

En el hueso coexisten varios tipos de células (ver Tabla 1). Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (o mesenchymal stem cells). Desde los trabajos de Friedenstein en 1976 se conoce que estas stem cells pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos (6), en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes.

Tabla 1
Tipos de células óseas

ESTROMA MEDULAR	TEJIDO ÓSEO
Stem Cells Hematopoyéticas	Osteoblastos
Stem Cells Mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipositos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células Endoteliales	Células Linfoides

Genética y factores de crecimiento

Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: Ihh (Indian hedgehog) y Shh (Sonic hedgehog) (7,8). También es esencial el factor de transcripción Cbfa1 (core-binding factor a-1, también llamado Runx2) (9, 10, 11, 12) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales.

Marcadores de diferenciación

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Cbfa1 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. El colágeno I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica.

Osteoblastos

Son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica (Ver Fig. 2a), con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (13). Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina43 (14).

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la

mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que los osteoblastos: 1) sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, 2) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, 3) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, 4) median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas (15) y 5) sintetizan factores de crecimiento.

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes, bordeantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15 %) (16). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración.

Las células limitantes bordeantes o de revestimiento (bone lining cells)

Son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, con escasos organelos. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo. Durante la formación del tejido óseo, los osteoblastos se aplanan en la superficie externa del tejido óseo y se transforman en ***las células de recubrimiento óseo***. Estas células pertenecen todavía a la familia de los osteoblastos aunque su rol no está claro, podrían formar solo un epitelio verdadero o bien constituir una barrera entre el espacio extracelular y los fluidos óseos o regular el intercambio iónico entre estos compartimentos. Presentan comunicaciones citoplasmáticas con los osteocitos, por lo tanto los osteocitos presentan un suplemento metabólico basado tanto, en la difusión vía sistema

canalículo lagunar, como por transporte intracitoplasmático. También las células de recubrimiento óseo pueden participar en la iniciación de la reabsorción al liberar factores activadores de osteoclastos y por contracción activa, lo cual podría exponer la superficie ósea a la adhesión de los osteoclastos. Junto con mantener la integridad de la matriz que los rodea, los osteocitos y las células de recubrimiento, participan en la homeostasis del calcio de los fluidos corporales.

Osteocitos

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de ella, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada (Ver Fig. 2b) y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplastos y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos o canalículos, llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (17).

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico a CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes.

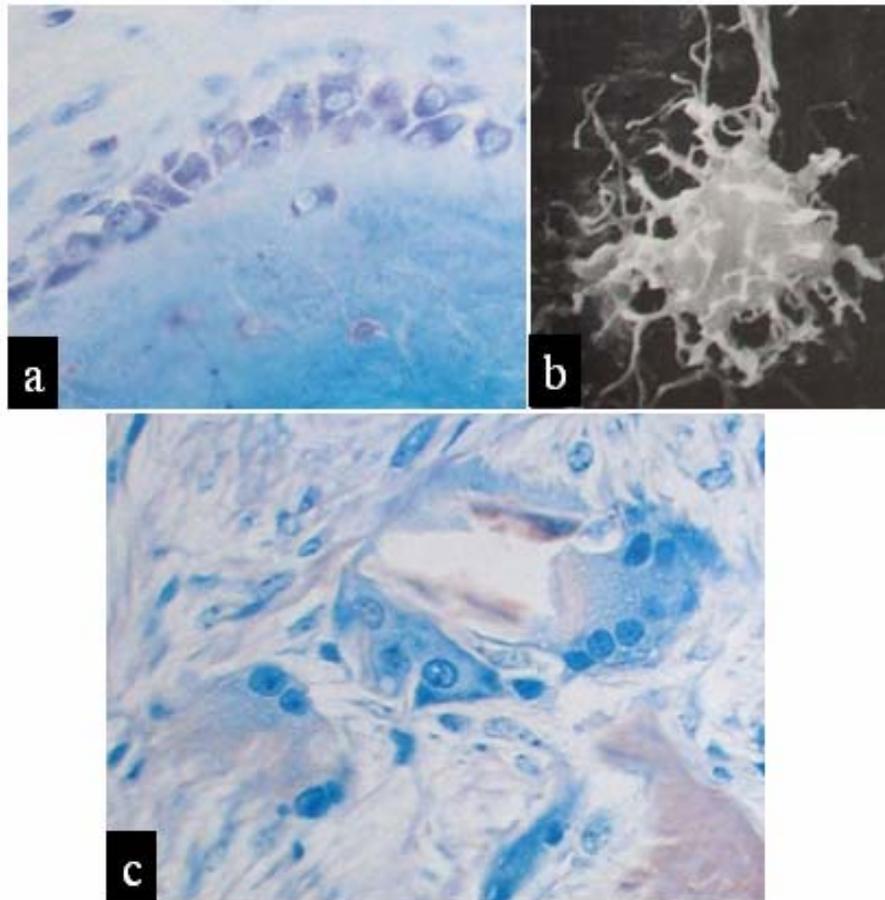


Figura 2: **a:** Osteoblastos vistos a través de microscopía óptica **b:** Forma estrellada de los Osteocitos vista a través de MEB **c:** Osteoclastos vistos a través de microscopía óptica. Fotos tomadas de referencia N° 2

Osteoclastos

Son las células encargadas de la reabsorción. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas (Ver Fig. 2c). Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además tienen receptores para calcitonina. Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (18).

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por su borde en cepillo, sellando los bordes del área mediante unión por integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\text{av}\beta 3$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc, que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después.

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3

moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL (receptor activator of NFκB ligand) antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor) (19) es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (20). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto *in vivo*, como *in vitro* son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF.

Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.

DESARROLLO Y CRECIMIENTO ÓSEO

Dos son los prerequisites indispensables para la formación ósea: un amplio suplemento sanguíneo y el soporte mecánico.

Los osteoblastos actúan en la formación ósea solo en cercanía de vasos sanguíneos. Por otra parte se requiere de una superficie estable y sólida para la elaboración de un tejido óseo altamente organizado. En la osificación membranosa o directa, en el seno del tejido conjuntivo se diferencian células osteoprogenitoras formándose centros de nucleación para la deposición ósea. En la osificación endocondral el cartílago hialino cumple esta función, el cual es cubierto y luego sustituido por hueso.

CRECIMIENTO Y REMODELADO DEL HUESO CORTICAL

Durante el desarrollo embrionario, la forma de los huesos individuales es elaborada ya sea por osificación membranosa o endocondral. En el período fetal y postnatal, los huesos sufren tres cambios: crecimiento en longitud y diámetro, modelado por el periostio y endostio y finalmente remodelado (renovación y sustitución del tejido óseo). Durante todas estas fases existe una íntima relación entre las células óseas y los vasos sanguíneos, de ahí que estos procesos óseos influyan en el patrón del suplemento sanguíneo.

Crecimiento longitudinal

La osificación endocondral es la responsable del aumento del tamaño de la epífisis y de la precisa formación de las superficies articulares.

Durante el crecimiento, el engrosamiento de los huesos y el modelado de su forma está basado en actividades de formación y reabsorción derivadas del periostio y del endostio. Básicamente la diáfisis de los huesos largos crece en diámetro por aposición del periostio y reabsorción endostial. Si la aposición supera a la reabsorción existirá un aumento en el grosor de la corteza. En el adulto esta actividad cesa y un diámetro y grosor cortical constante de la pared son mantenidos. En las personas mayores la reabsorción endostal puede exceder la aposición periostal, resultando en un aumento de las cavidades medulares a expensas del grosor cortical (21).

El modelado de la forma ósea es regulado por la distribución espacial de las actividades de formación y reabsorción como también por los cambios en el grado de aposición. En lugares donde se depositan lamelas circunferenciales, el crecimiento se restringe de 1 a 2 μm . por día. Si un crecimiento más rápido se requiere, un compuesto de

hueso lamelar y reticular es depositado, resultando en la formación de osteones primarios. La capacidad del hueso reticular de formar crestas o cordones es activada en orden a producir muescas y luego túneles alrededor de vasos sanguíneos orientados longitudinalmente. Posteriormente estos se van estrechando con la deposición de capas concéntricas hasta que la formación de los osteones primarios es completada. Este mecanismo resulta en un aumento de la aposición diaria, principalmente porque el crecimiento del hueso reticular no depende del grado de formación de matriz, sino más bien de la disponibilidad y la proliferación de nuevos osteoblastos.

Remodelado cortical: formación del osteón secundario

Los osteones primarios son formados durante el crecimiento aposicional, mientras que los osteones secundarios resultan de la sustitución, la cual es iniciada por la reabsorción seguida por la formación ósea. Existe una secuencia de remodelado en la que primero un canal de reabsorción es formado por osteoclastos, luego, los osteoblastos aparecen y comienzan a rellenar este canal con lamelas concéntricas a un vaso sanguíneo. Los osteones secundarios corren paralelos a lo largo del eje de los huesos y su largo es difícil de medir porque sufren frecuentemente ramificaciones, aunque por lo general su estructura raramente supera los 2 a 3 mm. de largo y se encuentran interconectados por canales vasculares transversales (canales de Volkmann) a intervalos de 0.5 a 1 mm.

Los osteones secundarios están siempre separados de la matriz que los rodea por una línea de cemento.

Secciones longitudinales de osteones en formación han mostrado que la reabsorción y formación ósea están asociadas en el tiempo y el espacio y ocurre en sitios pequeños de remodelado llamados “unidades metabólicas óseas” (BMUs). En el extremo de un canal de

reabsorción los osteoclastos se disponen en un cono de corte, luego avanzan longitudinalmente y simultáneamente ensanchan el canal hasta su diámetro final. Un loop vascular sigue a los osteoclastos y se aloja en el centro del canal siendo rodeado por células perivasculares, osteoclastos y osteoblastos precursores. Las paredes del canal son ocupadas por células mononucleadas, lo que corresponde a la fase de reserva de 1 a 2 días. Luego aparecen los osteoblastos que depositan material osteoide, el cual mineralizará entre los 8 a 10 días posteriores con lo que el canal asume una forma cónica. La formación completa del osteón requiere, dependiendo de la especie, de 2 a 4 meses.

FORMACIÓN Y REMODELACIÓN DEL HUESO ESPONJOSO

Desarrollo y crecimiento del hueso esponjoso

En el desarrollo embrionario temprano, aparecen trabéculas de un esponjoso primario como condensación en el mesénquima, siempre en vecindad de vasos sanguíneos. Esta osificación membranosa toma lugar principalmente en el esqueleto cefálico (neuro y esplancocraneo), resultando en la formación de los maxilares (21).

En los huesos largos, la epífisis es inicialmente formada en centros de osificación secundaria y mas tarde completada por osificación endocondral desde el cartílago articular.

Remodelado y adaptación funcional del hueso esponjoso.

El modelado y el remodelado continúan después del cese del crecimiento óseo. El modelado indica un cambio en la forma, mientras que el remodelado significa reemplazo de tejido o sustitución. El modelado específico implica cambios en la arquitectura del hueso medular que resultan en una adaptación estructural a la carga funcional prevalente o de

acuerdo a la Ley de Wolf. Esta adaptación permite al hueso oponerse a un estrés determinado con una mínima cantidad de material. Esto alivia el peso y conserva energía metabólica.

Remodelado del hueso trabecular.

El remodelado significa sustitución del tejido óseo, sin un cambio en la arquitectura. Esto mejora la calidad del tejido, tanto en sus propiedades mecánicas como metabólicas.

El remodelado reemplaza porciones pequeñas con nuevo hueso lamelar, comenzando con una agrupación local de osteoclastos los que forman una cavidad en la superficie trabecular. Al final de la fase reabsortiva los osteoclastos se mueven o desaparecen y luego de un corto intermedio o fase reversa, los osteoblastos comienzan depositando nuevo hueso (fase formativa), formando unidades nuevas de hueso confinadas por una línea de cemento y que es considerada, en analogía con los osteones, una unidad estructural ósea (BSU). Por su extensión superficial en el esqueleto humano, el remodelado juega un papel importante en la patogénesis de enfermedades metabólicas óseas, como la osteoporosis.

BIOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

Muchos tejidos del cuerpo sufren regeneración fisiológica, como los epitelios, células sanguíneas, glándulas. Otros no pueden proliferar, como los tejidos nerviosos o las fibras musculares. El remodelado óseo cortical y trabecular representa un modelo de regeneración tanto celular como de su matriz.

La regeneración reparativa ocurre cuando los tejidos se pierden por injuria o enfermedad. Los tejidos de soporte tienen distintas capacidades de reparación, así el cartílago articular es prácticamente incapaz de regenerar, los tejidos conectivos altamente diferenciados como ligamentos y tendones nunca lograrán el nivel original de organización y repararán con cicatriz y con reducción de su resistencia mecánica. El hueso es el único que tiene el potencial para restaurar su estructura original completamente, siempre y cuando algunas condiciones básicas se aseguren, como un amplio suplemento sanguíneo y estabilidad mecánica, provista de una base sólida.

ACTIVACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

Algún tipo de lesión, como por ejemplo fracturas, inserción de implantes, interrupción del suplemento sanguíneo, activan un proceso de regeneración ósea local por la liberación de factores de crecimiento e inductores. El hueso es una de las fuentes más ricas en factores de crecimiento (GF). Entre los GF algunos son producidos por células óseas, como el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),

mientras que otros son sintetizados por tejidos en relación al hueso, como el factor interleuquina – 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF α).

Entre los factores inductores óseos encontramos la osteogenina de Lacroix (22) y la familia de las proteínas morfogenéticas (BMP).

Para clarificar el concepto de osteoinducción, Friedenstein (6, 23) distinguió dos tipos de células, las células osteoprecursoras determinadas y las células osteoprecursoras inducibles. Las primeras se encuentran en los tejidos en directa vecindad al hueso, como las células del estroma medular óseo, del periostio, del endostio y de los canales intracorticales. Estas células reaccionan a la inducción con proliferación y diferenciación directa a osteoblastos y por lo tanto formando hueso directamente. Las células osteoprecursoras inducibles se encuentran lejos del hueso. Estas células tipo fibroblastos son abundantes en los tejidos conectivos subcutáneos, en los músculos esqueléticos y en las cápsulas de riñones y bazo. Su reacción a estímulos inductivos es más compleja y la formación de hueso es vía endocondral.

La cascada de eventos que se gatilla por los numerosos factores de crecimiento no está clara todavía, sin embargo, se sabe que solo algunas BMP y otros miembros de la familia de los TGF- beta son capaces de inducir formación de hueso heterotópico, es decir, formación de hueso en un lugar donde fisiológicamente no existe normalmente.

REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO

Sistémicamente el remodelado óseo es activado por las hormonas del crecimiento, las hormonas tiroideas y paratiroides e inhibidas por la calcitonina y la cortisona. Localmente es activado por algún trauma óseo, como fracturas, acciones quirúrgicas o inserciones de implantes. Una interrupción temporal del suplemento sanguíneo con desvitalización asociada

y necrosis del tejido óseo resulta en una sustancial activación del remodelado, incluso sin lesión mecánica alguna. La iniciación de la activación de la reabsorción y formación ósea se basa en la acción de múltiples factores comprometidos en la activación de osteoclastos, proliferación y diferenciación de osteoblastos, formación de matriz y mineralización.

PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

Como se mencionó anteriormente, el hueso posee un asombroso potencial de regeneración y restaura perfectamente su estructura original y sus propiedades mecánicas, pero esta capacidad tiene sus limitaciones y puede fallar en ciertas condiciones. Entre los factores que impiden la reparación se encuentran:

- a) Falla en la vascularidad.
- b) Inestabilidad mecánica.
- c) Defectos sobredimensionados.
- d) Tejidos competitivos de alta actividad proliferativa.

En el caso de las fracturas óseas por ejemplo, la falla en la vascularización es causa de la necrosis de los fragmentos e impide la unión, o provoca su pérdida. La inestabilidad produce un callo fibrocartilaginoso e impide la osificación endocondral al inhibir la mineralización del fibrocartílago. La pérdida de fragmentos o la remoción de aquellos que presentan necrosis, crea defectos demasiados grandes para ser llenados por hueso espontáneamente. Finalmente las células de los tejidos blandos vecinos pueden proliferar más rápidamente y ocupar el sitio del defecto antes de lo que el hueso lo pueda hacer. De hecho el tejido conectivo fibroso regenera más rápido que la mayoría de los tejidos altamente diferenciados y puede producir una cicatriz en el sitio de la lesión. La regeneración ósea

puede competir con el tejido fibroso, llegando incluso a reemplazarlo parcialmente cuando éste se ha formado antes.

Cuando alguno de estos factores está ausente, la regeneración ósea no puede llevarse a cabo y hay que empezar a utilizar técnicas regenerativas como la ***Regeneración Ósea Guiada*** (ROG) que es un método efectivo y predictivo para generar hueso en zonas donde está ausente, antes o durante la instalación de los implantes oseointegrados. Estudios en animales y humanos avalan la eficacia de este principio (21, 24, 25)

TÉCNICAS DE REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA

Para llevar a cabo estas técnicas de regeneración ósea guiada, pueden utilizarse:

- ❖ Membranas
- ❖ Injertos Óseos

Membranas

Se utilizan membranas de estructura micro porosa "selectiva", puesto que permiten el paso de los nutrientes para la formación ósea, pero impiden el paso de células no deseadas hacia la zona de generación ósea.

Podemos encontrar dos grupos de membranas, las reabsorvibles y no reabsorvibles (26). Las reabsorvibles están generalmente fabricadas de politetrafluoretileno expandido, necesitan una segunda intervención quirúrgica para su retiro. Las membranas reabsorvibles en cambio, se clasifican en dos tipos: las hechas con polímeros sintéticos y las hechas con materiales naturales.

Las hechas con materiales sintéticos pueden tener ácido poliláctico, ácido glicólico. Como es el caso de Atrisorb® (Collagenez Pharmaceuticals) que está compuesto por Ac poliláctico, Resolut® (Goremedical) contiene ácido poliláctico y glicólico, esta barrera mantiene su integridad por más de 8 a 10 semanas y es reabsorbida a los 6 meses aproximadamente. (27)

Entre los materiales naturales encontramos las matrices de colágeno, las de sulfato cálcico y las de proteínas del esmalte. Las membranas de colágeno son principalmente de colágeno tipo I, el cual mantiene sus funciones por semanas. Muchas son las razones para usar este material: entre ellas se describe que **1)** el colágeno es una de las proteínas más abundantes del cuerpo humano, **2)** posee propiedades hemostáticas lo cual facilita la agregación plaquetaria e incrementa el cierre y el potencial de cicatrización de las heridas, **3)** tiene propiedades quimiotácticas para los fibroblastos y es de fácil manipulación. (27). presenta una alta biocompatibilidad: pues es un producto natural degradado enzimáticamente, capaz de promover la adhesión, la migración y la proliferación celular. Además **4)** actúa como barrera: provee espacio e impide el paso de células epiteliales, además actúa como una barrera semi-permeable, permitiendo el paso de nutrientes y el intercambio de gases. **5)** Es Reabsorbible: (28) lo cual elimina la necesidad de una segunda cirugía. **6)** Tiene alta disponibilidad.

Injertos

Se denominan injertos óseos a todos los materiales sintéticos o biológicos que pueden emplearse para rellenar defectos en el hueso, con el objetivo de obtener la regeneración y reparación de éste. La utilización de injertos óseos es una de las técnicas quirúrgicas más empleadas en la actualidad, ya que son muchas las situaciones en que la pérdida ósea es muy

importante y se necesita adyuvante para la reconstitución del tejido óseo perdido. El material ideal para solucionar todos estos problemas es el proveniente del mismo paciente (hueso autólogo) debido a que no trae consigo una respuesta inmune del paciente contra el material injertado, así como también se evita el riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, hay ocasiones en que el volumen de hueso necesario es muy grande, justificándose la utilización de materiales sustitutos.

Tres conceptos importantes de definir son:

Osteogénesis: Mecanismo mediante el cual células óseas vivas (preosteoblastos y osteoblastos), que son transplantadas de una parte a otra del mismo organismo, establecen centros de formación y crecimiento óseo. Propiedad que corresponde a los injertos de hueso autólogo.

Osteoinducción: es la capacidad de un tejido para inducir la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales, provenientes del lecho receptor o de los alrededores, en osteoblastos, estimulando así la neoformación ósea a nivel del injerto y del lecho receptor (29).

Esta capacidad la posee el hueso autólogo, los factores de crecimiento localizados en el plasma, y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP).

Osteoconducción: Es la capacidad del injerto de crear un soporte estructural para la neoformación ósea (28). Son ejemplos de este tipo, el hueso autólogo, la fibrina autóloga, hueso humano liofilizado, la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico, los cristales cerámicos bioactivos, etc.

Materiales Aloplásticos

Son exclusivamente productos sintéticos biocompatibles desarrollados para satisfacer un gran número de indicaciones. Son fabricados en diversas texturas, tamaños de partículas y formas. Se pueden clasificar en Cerámicas, Polímeros y Composites; los más empleados son las cerámicas que pueden ser Bioinertes (óxido de aluminio o titanio) y/o Bioactivas (fosfato cálcico). Las cerámicas bioinertes no se unen directamente al hueso huésped y se mantienen en contacto con este por medios mecánicos. Las cerámicas bioactivas por su parte se unen químicamente al hueso receptor y son el principal grupo de aloplastos usado para el aumento óseo, incluyen a la hidroxiapatita sintética y el fosfato tricálcico.

Materiales Biológicos

Hueso autólogo: es el gold Standard de los materiales de relleno, ya que posee la capacidad de ser osteogénico, osteoconductor y osteoinductor. Puede ser obtenido de fuentes intraorales tales como el mentón y/o la zona retromolar (30) o de zonas extraorales tales como la calota o la cresta ilíaca (31, 32). Este hueso puede usarse en forma de bloques sujetos con tornillos, con los propios implantes o bien, en forma particulada.

El uso de este material, presenta ciertas desventajas tales como el aumento de la morbilidad (dos sitios quirúrgicos en el caso de fuentes extraorales), limitado volumen disponible (en el caso de utilizar fuentes intraorales). En los casos en que se usa hueso autólogo de fuentes extraorales, tales como la cresta ilíaca o la calota es necesario además hospitalizar al paciente, administrar anestesia general y también tiene un alto costo económico.

Hueso alógeno: son injertos procedentes de miembros de la misma especie, pero no del mismo individuo. El más común es el hueso liofilizado (hueso de cadáver

desmineralizado, secado, congelado). Los datos histológicos (33) de estudios donde se usó hueso liofilizado como material de relleno, muestran partículas de hueso no vitales rodeadas de tejido conectivo sin contacto con el hueso neoformado.

Xenoinjerto: son injertos provenientes de especies distintas a la especie receptora. El xenoinjerto más estudiado en implantología es la hidroxiapatita bovina (hueso bovino inorgánico desproteinizado). Histológicamente, se ha encontrado al retirar implantes injertados con hidroxiapatita bovina en animales y humanos un contacto íntimo entre el hueso neoformado y las partículas de hidroxiapatita bovina con presencia de osteoblastos y osteoclastos, lo cual es indicativo de que la formación de nuevo hueso se ve acompañada de un proceso de aposición y reabsorción del material de relleno (34).

Al analizar el porcentaje de hueso vital neoformado tras injerto con hidroxiapatita bovina se ha observado que este porcentaje aumenta significativamente al mezclar la hidroxiapatita bovina con hueso del receptor, por lo que esta combinación es recomendable (40).

También existen xenoinjertos derivados del coral, el cual está constituido por más de un 98% de carbonato de calcio en una forma cristalina. El hueso es irradiado para su esterilización (Biocoral®),

Uno de los xenoinjertos más utilizados es el Bio-Oss®, un hueso bovino desproteinizado, desmineralizado y esterilizado. En el comercio se presenta en granulado y en bloques, con un tamaño de cristales de 10 nm. El hueso bovino obtenido es sometido a una calcinación (800 – 1200°C) con lo cual se produce una ceramización de los cristales de hidroxiapatita, lo que determinaría un aumento en el tiempo de reabsorción total de 4 años o más (35).

Bio-Oss ha demostrado ser altamente biocompatible con tejidos duros orales en humanos y animales, además cumple con los criterios de ser un material osteoconductor, actuando como un andamio para la formación ósea (36). Se presenta en tres variedades, Bio-Oss Spongiosa Small, Bio-Oss Spongiosa Large y Bio-Oss Collagen (Ver Fig. 3a).

Posee un tamaño de partícula de 0.25 – 1 mm en el caso del Bio-Oss Spongiosa Small, de 1 - 2 mm en el Bio-Oss Spongiosa Large y se le agrega además colágeno (10%) en el caso del Bio-Oss Collagen con lo que adopta una forma de un paralelepípedo a diferencia de la forma granular que posee en las otras dos presentaciones. Posee una porosidad de un 75% – 80% (37), ocupando así solo el 20 a 25% del volumen total del sitio donde se coloca, dejando así gran parte del volumen disponible para la formación y remodelación ósea (38). Tiene un tamaño de partícula que varía con cada presentación, sus macroporos y microporos son de tamaño similar al hueso cortical (37) y facilitan el crecimiento de las células (Ver Fig. 3b). Es importante también destacar que por su delicada estructura no es recomendable que el Bio-Oss® reciba ningún tipo de carga mecánica (39).

Estudios histológicos realizados a los seis meses después de colocar el injerto óseo muestran que las partículas de Bio-Oss® ocupan un 25% a un 30% del área de las muestras obtenidas (40, 41) y un 34% a un 40% de ellas estaban en contacto con hueso (40, 41, 42)

Existe una gran discusión respecto a la degradación del Bio-Oss®, encontrándose estudios que relatan un rápido reemplazo por hueso nuevo y en otros existe un escaso o nulo reemplazo.

Piatelli et al 1999, reportó el uso de Bio-Oss:

- A los 6 meses: partículas de Bio-Oss son fácilmente distinguibles del hueso nuevo y la mayoría de las partículas están rodeadas por tejido óseo neoformado. El análisis histoquímico mostró que la mayoría del hueso formado era altamente mineralizado y en

unas pequeñas áreas de la interfase hueso/partícula era posible encontrar material osteoide. El análisis histomorfométrico mostró un 40% de espacios medulares, 30% de hueso nuevo y 30% de partículas de Bio-Oss.

- A los 9 meses: gran similitud a la encontrada a los 6 meses, en algunos canales de Havers son observables pequeños capilares, células mesenquimáticas y osteoblastos formando hueso nuevo.
- A los 18 meses: todas las partículas eran fácilmente reconocibles debido a su baja afinidad por la tinción, al tener bajo contenido de colágeno. El análisis histoquímico muestra un aumento de la mineralización del hueso en formación. Todos los canales de Havers han sido llenados por hueso nuevo y han adquirido la apariencia de lagunas de osteocitos.
- A los 4 años: aún son fácilmente reconocibles las partículas de Bio-Oss. El grado de mineralización encontrado en el hueso es similar al de los 9 y 18 meses. Se observan osteoclastos reabsorbiendo partículas de Bio-Oss y algunas de estas partículas se observan rodeadas por células gigantes multinucleadas.

Bio-Oss® ha sido cuestionado en relación a su seguridad, ya que diversos autores (43, 44) plantean que podrían encontrarse trazas proteicas dentro de sus componentes. Por el contrario otros autores (45, 46) dicen que una completa ausencia de proteínas en su composición ha sido demostrada, por lo cual es un material seguro respecto a la transmisión priónica de la Encefalopatía Bovina Espongiforme o Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob.

Los materiales de injerto generalmente se presentan como granulados, cuya forma y morfología superficial influyen en sus propiedades físicas y biológicas. Los materiales de regeneración ósea utilizados en clínica presentan distinto comportamiento biológico dentro del mismo tipo de materiales. La forma de las partículas determinará principalmente la osteoconducción, siendo favorecida por los gránulos de formas irregulares, ya que dejan un

gran espacio intergranular. La morfología superficial por su parte influye de gran manera en la velocidad de reabsorción que presentarán las partículas, siendo fácilmente reabsorbibles los granulados con superficies rugosas y con gran cantidad de poros, debido a que poseen un área mayor de contacto con el medio circundante, en comparación a partículas de una superficie más lisa y con baja cantidad de poros. Ha sido demostrado el efecto positivo de los poros que se pueden encontrar en estas partículas los cuales favorecen el crecimiento de capilares (47).



Figura 3: **a:** Presentaciones del Xenoinjerto Bio-Oss. Fotos tomadas de referencia N° 48 **b:** A la izquierda vista de Bio-Oss a 50x a través de M.E.B.; a la derecha vista de hueso humano a 50x a través de M.E.B. Fotos Tomadas de referencia N° 49

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El Xenoinjerto desarrollado por la Comisión Chilena de Energía Nuclear presenta características morfológicas ultraestructurales similares al Xenoinjerto comercial Bio-Oss®.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente la estructura del xenoinjerto desarrollado por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) y compararla con un xenoinjerto comercial (Bio-Oss®)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar características morfológicas y volumen ocupado por las partículas del xenoinjerto desarrollado por la CCHEN y por el Bio-Oss.
- Determinar ultraestructuralmente el tamaño promedio, y el rango de tamaño de las partículas del xenoinjerto desarrollado por la CCHEN y Bio-Oss.
- Analizar la densidad presentada por las partículas de cada muestra de hueso CCHEN,y Bio-Oss.
- Comparar morfología, tamaño y densidad de las partículas del xenoinjerto desarrollado por la CCHEN con las del Bio-Oss®

MATERIAL Y MÉTODO

OBTENCIÓN DEL HUESO LIOFILIZADO CHILENO

El xenoinjerto nacional fue elaborado por el personal de la Comisión Chilena de Energía Nuclear en el Departamento de Aplicaciones Nucleares en la Sección Salud y Alimentos. El hueso fue preparado por los investigadores de la CCHEN quienes siguieron el protocolo del Hospital Tata Memorial, Bombay, India. A continuación se explica brevemente: el hueso obtenido de ganado bovino, es colocado en un recipiente estéril al cual se le agrega alcohol al 70% para eliminar el virus del VIH y las bacterias. Se lava en agua filtrada y se eliminan los tejidos blandos para poder cortar el hueso en las formas y tamaños deseados. El hueso ya cortado se coloca en una solución de Na_3PO_4 al 2.5%, esta solución es anticoagulante, y ayuda a dispersar la sangre en los huesos. Los huesos inmersos en la solución de Na_3PO_4 deben mantenerse en un refrigerador durante la noche. El hueso debe ser lavado bajo un fuerte chorro de agua para eliminar la mayor cantidad posible de medula ósea, una vez lavado es colocado en una solución de Papaína al 1% en un refrigerador durante toda la noche, la cual digiere las proteínas y facilita la eliminación de los tejidos blandos que aun existan. Posterior a esto los trozos de hueso deben ser nuevamente sumergidos en papaína al 1%, pero esta vez fueron puestos en un baño maría de agitación a 58°C por 1-3 horas; si aparece grasa superficial se agrega una nueva cantidad de papaína fresca calentada, lo que permitirá extraer la grasa. Este proceso debe repetirse hasta que desaparezca la grasa, luego se elimina la papaína con un lavado con agua caliente.

Si aún existen restos de sangre y partículas de medula ósea, mantener el hueso toda la noche en refrigeración en Na_3PO_4 , al 2,5 %, remover el Na_3PO_4 con un enjuague de agua destilada, en esta etapa el hueso debiera verse completamente blanco. Los injertos están listos para ser liofilizados por 48 a 72 horas, para lo cual se ponen en bandejas especiales y se congelan a -60°C . Durante este proceso se va extrayendo el agua del hielo a través de una combinación de calor y vacío en una cámara y atrapado en un condensador, el tiempo requerido para retirar el agua depende del tamaño forma y contenido crítico de agua del hueso.

Una vez liofilizado se procede a triturar el hueso y tamizarlo hasta el tamaño deseado, los injertos se empaacan en bolsas de polietileno de 0.5g y son selladas. Los injertos envasados son esterilizados con radiación gamma 25 kGy (2,5 Mrad), luego se envían muestras para un cultivo microbiológico, el resto de los injertos se mantiene en cuarentena hasta que se obtengan los resultados del cultivo. El hueso obtenido tiene un 24.1 ± 0.3 % de Ca y un 10.8 ± 0.1 % de P.

Para este estudio se analizaron tres tamaños de partículas del hueso CCHEN, entre 0.30 y 0.5mm, 0.85 y 1mm y mas de 1mm y se analizó un hueso control ya comercializado de tamaño de partícula entre 0.5 a 1 mm (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland).

ANÁLISIS DE DENSIDAD DEL HUESO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y HUESO COMERCIAL BIO-OSS®

Se midió la densidad de las muestras de hueso, tanto el de la CCHEN como el Bio-Oss. Se utilizaron tubos endorff de 100 ul, los cuales fueron llenados completamente con ambos tipos de hueso, teniendo la precaución de no presionarlo hacia el fondo, sino que solamente

vibrándolo. Con este método se igualó el volumen de ambas muestras, las cuales se pesaron en una balanza de precisión para obtener su densidad

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Partículas de hueso desarrollado por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) y Hueso comercial (Bio-Oss®) fueron pegadas en soportes metálicos usando adhesivo “double face” (3M, Minnesota, USA). Se realizó una marca a cada soporte para su identificación bajo el microscopio.

Las muestras se metalizaron con una capa de oro (200 A°, 20mA, 10 mn) en un equipo de metalizado (Polaron SEM coating unit E5000. Unidad de Microscopía Electrónica-CESAT, ICBM, U. de Chile) y fueron observadas en un microscopio de barrido (Digital Scanning Microscope DSM 940, Zeiss. Unidad de Microscopía Electrónica-CESAT, ICBM, U. de Chile).

Sobre 1 muestra de 1g de cada tamaño de hueso, al momento de la observación a un aumento de 50x, se midió el tamaño de 16 partículas elegidas al azar de cada muestra. Utilizando el cursor del microscopio electrónico de barrido se midieron las dos dimensiones mayores de cada partícula en dos sentidos del espacio, el largo en el eje mayor y el ancho (perpendicular al largo). Se realizaron además microfotografías para comparación morfológica a 20x, 50x, 1000x y 3000x; el negativo de 35 mm fue digitalizado utilizando un scanner Prime Film 1800u (Pacific Image Electronics) con una resolución de 600 dpi. (Parámetros de escaneo: Escala al 200%, modo gris, imagen calidad, contraste automático,

gamma 100%) Sobre 4 microfotografías a 20x dos observadores calibrados analizaron el área y la densidad de las partículas de hueso eligiendo al azar 4 partículas por cada foto (2491 x 1699 pixeles). Usando el programa ImageJ (Image Processing and análisis in Java, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.); se calculó la media de grises de cada partícula, con un rango de 0 – 255, siendo 0 negro y 255 blanco (8 BIT, 50), (Ver Figura 5).

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para evaluar las características morfológicas se analizaron en forma descriptiva el aspecto del tejido óseo, el tamaño y forma de las partículas. Se analizó además la densidad de las diferentes partículas óseas de distintos tamaños en microfotografía SEM, obteniéndose una media de densidad de grises de cada tamaño de partícula.

Los datos fueron tabulados usando el programa Excel, se calcularon las medias, desviaciones estándar y los valores mínimos y máximos. Usando el programa STATA 7 se determinó la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas mediante el test de Swilk y se vio que ellas no tenían una distribución normal. Las diferencias respecto al control Bio-Oss se analizaron mediante el test de Wilcoxon con un nivel de significancia $p < 0.05$.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y VOLUMÉTRICA DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y DE BIO-OSS

Las muestras de los diferentes particulados óseos preparados por la CCHEN se presentan en frascos de vidrio con un contenido de 1 gramo de particulado por frasco. Ellos son esterilizados por radiación gamma y muestran un sello que indica el lote y la fecha de esterilización. El etiquetado indica además el código del frasco, tamaño de partícula, cantidad, fecha de vencimiento.

Las muestras de hueso elaboradas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear de tres tamaños (0.30 – 0.5 mm; 0.85 – 1 mm; mayores de 1 mm) y el Bio-Oss (0.25-1 mm) fueron preparadas para observación y análisis morfológico en microscopía electrónica, adheridas a la superficie de un soporte metálico, metalizadas y observadas en SEM a un aumento de 20x, 50x, 500x, 1000x, 2000x, 3000x y se tomaron las respectivas fotografías. Para el posterior análisis morfológico y morfométrico de densidad de partículas (Ver Fig. 4).

Macroscópicamente se observó cada particulado evidenciándose la diferencia de tamaños entre las muestras de CCHEN respecto al hueso particulado control, Bio-Oss (0.25-1 mm), el cual presentó partículas mas uniformes en tamaño y forma, equivalente al particulado de 0.3 - 0.5 mm CCHEN. Se observó además una evidente variación en la coloración siendo Bio-Oss mas blanco (Ver Fig. 4b)

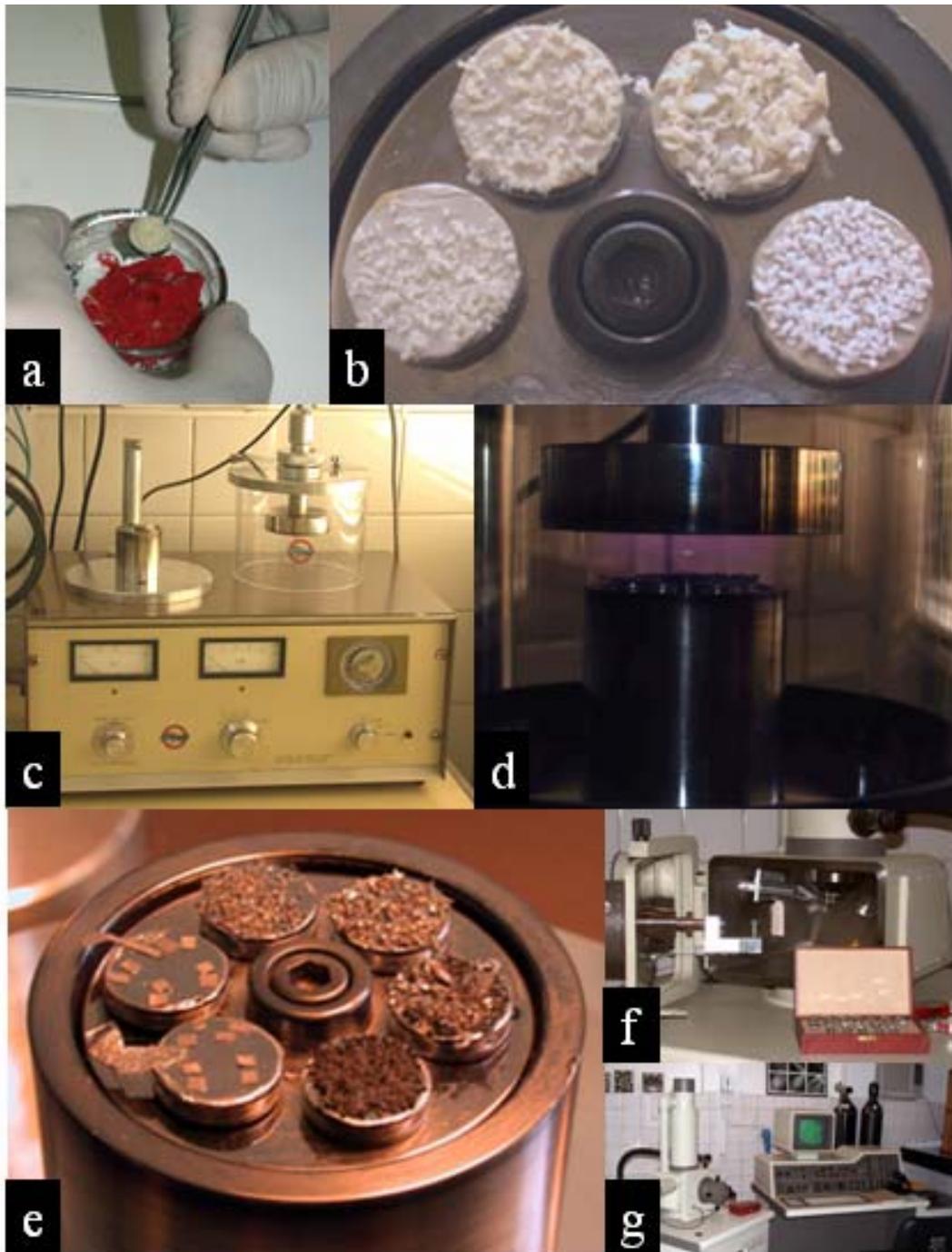


Figura 4: **a, b:** Adhesión de las partículas a los soportes metálicos **c, d y e:** Metalizado de las partículas **f y g:** Microscopio de barrido (Digital Scanning Microscope DSM 940, Zeiss. Unidad de Microscopía Electrónica-CESAT, ICBM, U. de Chile)

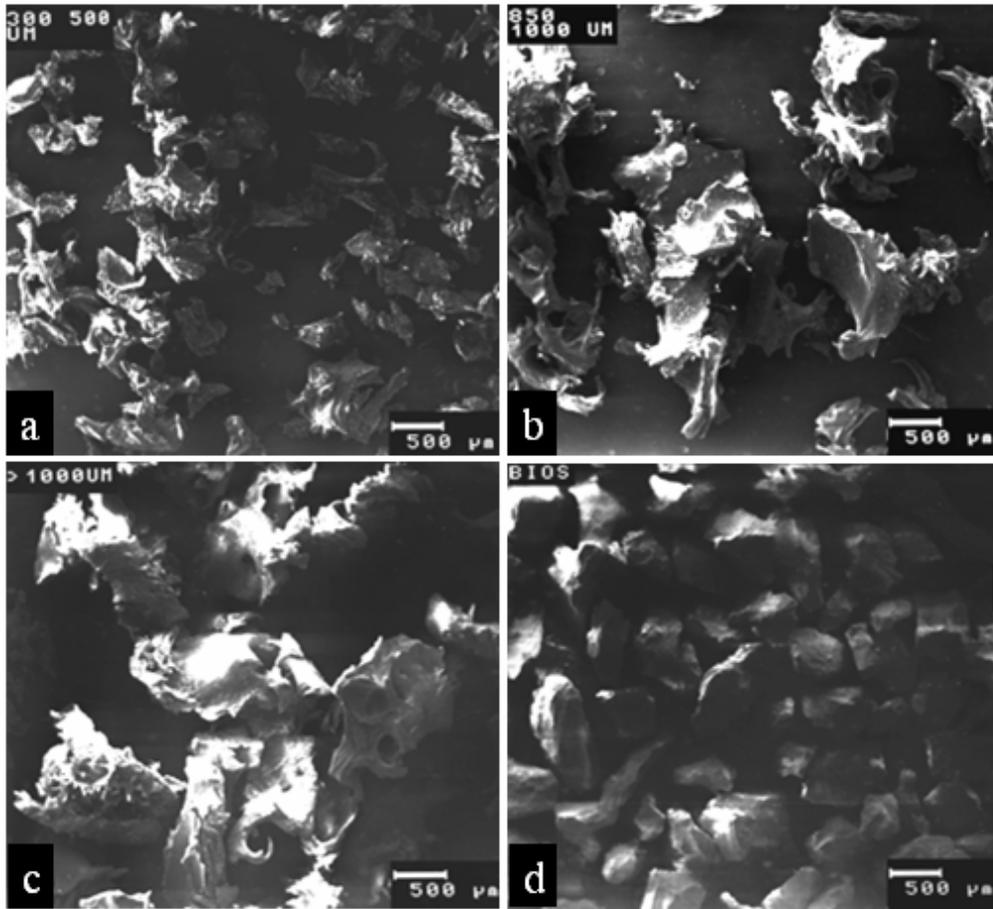


Figura 5: Vista de los diferentes particulados a través de M.E.B. con un aumento de 20x **a:** partículas de 0.3 – 0.5mm **b:** partículas de 0.85 – 1mm **c:** partículas mayores de 1mm **d:** partículas de Bio-Oss

Microscópicamente el granulado de tejido óseo de 0.30 – 0.5 mm CCHEN presentó partículas de variables tamaños, la mayoría de forma irregular y con muchos bordes filosos (ver Fig. 5a).

Las partículas de 0.85 – 1 mm del granulado óseo CCHEN, se presentaron más grandes que las anteriores, con una porosidad intrapartícula muy variable, observándose zonas más lisas y otras con pequeños poros. (Ver Fig.5b).

Las partículas mayores de 1 mm mostraron una estructura de hueso normal, con sistemas de Havers, osteoplastos, estructura laminillar y canalículos (Ver Fig. 5c). A mayor

aumento (50x) los trozos de hueso se observan bastante porosos en forma irregular semejantes a piedra pómez (Ver Fig. 6a).

Las partículas de Bio-Oss (0.25 – 1mm) presentaron una forma de paralelepípedo, muy regular, de superficie lisa, sin bordes filosos y un tamaño homogéneo, bastante diferentes al hueso chileno (CCHEN) (Ver Fig.5d). A un aumento de 3000x no se observaron poros en la superficie de las partículas, siendo ésta bastante regular, presentando un aspecto de arenado superficial (Ver Fig. 6b)

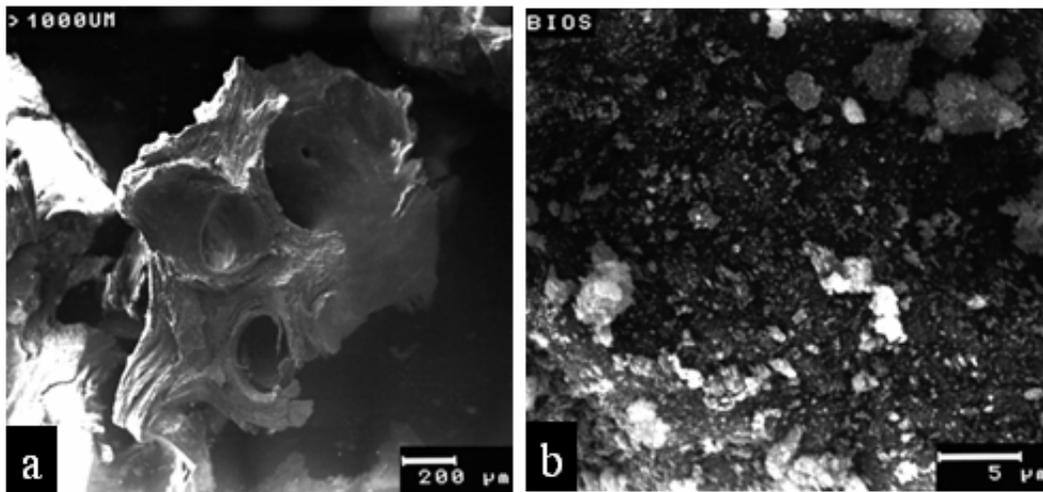


Figura 6: **a:** Microfotografía de una partícula de hueso CCHEN > 1mm, a un aumento de 50x **b:** Microfotografía de una partícula de Bio-Oss a un aumento de 3000x

Se analizó además el volumen relativo que ocuparon las partículas en un espacio dado por un tubo ependorff de 100 ul, los resultados son presentados en la Tabla 2. Nótese que la densidad de partículas de Bio-Oss en el mismo volumen fue el doble de la densidad de partículas de CCHEN de tamaños equivalentes (promedio de 2.9 g/ml vs 5.7 g/ml)

Tabla 2

Análisis volumétrico de partículas Óseas de Hueso preparado por CCHEN y Bio-Oss en un volumen conocido.

MUESTRA	VOL TUBO (ml)	PESO Del TUBO (g)	PESO TUBO + HUESO (g)	PESO HUESO (g)	DENSIDAD
0.3 – 0.5mm	0.1	0,4522	0,7777	0,33	3.3 g/ml
0.85 - 1.0 mm	0.1	0,4522	0,6887	0,24	2.4 g/ml
< 0.1mm	0.1	0,4522	0,6767	0,22	2.2 g/ml
BIO-OSS (0.25 - 1mm)	0.1	0,4522	1,0215	0,57	5.7 g/ml

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN Y BIO-OSS.

A un aumento de 50x utilizando el cursor del microscopio electrónico de barrido se midió el tamaño de las partículas eligiendo al azar 16 de cada muestra al momento de la observación. Las dos dimensiones mayores de cada partícula fueron medidas en dos sentidos del espacio, el largo en el eje mayor y el ancho (perpendicular al largo) (Ver Fig. 7). El promedio y la desviación estándar obtenidos para cada muestra observada se presentan en la Tabla 3. Asumiendo que todas las partículas eran cuadriláteras, se utilizaron estas medidas para obtener el área promedio de cada muestra.

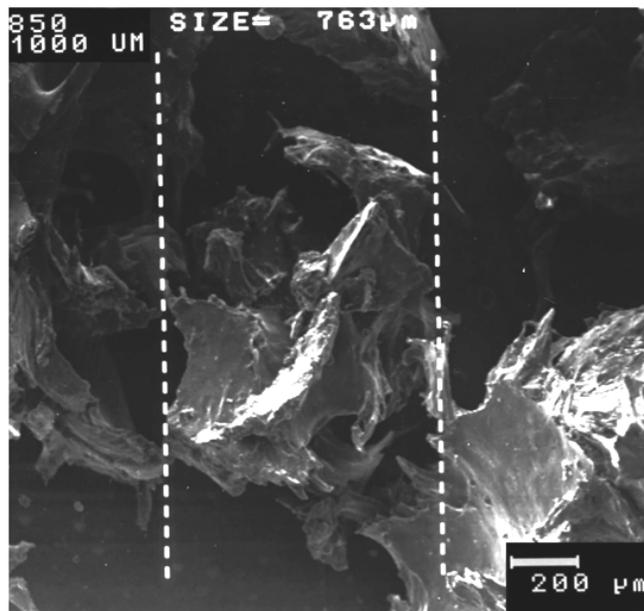


Figura 7: Microfotografía de una partícula de hueso CCHEN donde se aprecia, entre las paralelas, una de las dimensiones medidas en las partículas: 763um

Tabla 3

Promedio y desviación estándar del ancho y largo de las partículas medidas en microscopia electrónica de barrido a un aumento de 50x

Partículas de Hueso	Ancho (mm)	Largo(mm)	Área mm²
0,3 - 0,5 mm	0,40 ± 0,11	0,59 ± 0,13	0,24 ± 0,12
0,85 - 1 mm	0,67 ± 0,25	1,04 ± 0,32	0,75 ± 0,54
> 1 mm	1,08 ± 0,33	1,57 ± 0,28	1,73 ± 0,64
Bio-Oss 0,25 - 1 mm)	0,68 ± 0,16	0,98 ± 0,28	0,69 ± 0,33

Se analizó la variabilidad del tamaño de las partículas intragrupo observándose una gran variabilidad para los tres tipos de partículas de la CCHEN, no así para Bio-Oss que presentó una distribución homogénea normal.

Para analizar si la diferencia de las medias obtenidas de ancho, largo y área de las partículas de la CCHEN respecto a las de Bio-Oss era significativa, se compararon las mediciones obtenidas de las partículas 0,3 - 0,5 mm y 0,85 - 1 mm versus las obtenidas en Bio-Oss.

Se realizó el test de Swilk de las tres variables para analizar su distribución y se vio que ellas no tenían una distribución normal. Para comparar los dos grupos se usó entonces el test de Wilcoxon mostrando que la diferencia fue significativa para todas las mediciones (ancho $p=0.0005$, largo $p=0.0213$, área $p=0.0005$).

ANÁLISIS DE LA POROSIDAD RELATIVA PRESENTADA POR LAS PARTÍCULAS DE CADA MUESTRA DE HUESO CCHEN Y BIO-OSS.

En una microfotografía por cada muestra de hueso con aumento de 20x, se analizó el área y la densidad de 5 partículas elegidas al azar en cada foto a través de la media de grises con un rango de 0 – 255, siendo 0 negro y 255 blanco, usando el programa ImageJ. Los resultados del promedio de grises y la desviación estándar se observan en la Tabla 4

Tabla 4

Análisis de la densidad relativa del granulado de las distintas muestras según promedio de grises obtenido de cada microfotografía.

Tamaño de partícula analizada	Densidad Relativa de cada partícula (Promedio Grises)	St Desv
0.3 – 0.5 20x	56,33	52,95
0.85 – 1 20x	56,74	53,57
> 1 20x	63,83	65,57
Bio-Oss 20x	33,65	16,50

Obsérvese que las partículas de BioOss presentan menor gama de grises en su superficie mostrando menor diferencia o irregularidad de cada partícula.

COMPARACIÓN MORFOLÓGICA, DE TAMAÑO Y DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS DEL XENOINJERTO DESARROLLADO POR LA CCHEN CON LAS DEL BIO-OSS®

Con el fin de hacer la comparación morfológica, de tamaño y densidad entre las partículas CCHEN y Bio-Oss se promediaron las medidas del particulado de 0.3 – 0.5 mm y de 0.85 – 1 mm, ya que corresponde al rango de tamaño presentado por Bio-Oss en este

estudio (0.25 – 1 mm). Las partículas del hueso CCHEN que están dentro del rango de tamaño que posee Bio-Oss, poseen formas poco definidas, bordes muy irregulares y su superficie es bastante rugosa. Además, el tamaño de sus partículas es extremadamente variable, a diferencia del Bio-Oss que posee partículas de forma definida (paralelepípeda), bordes regulares, superficie lisa y tamaño homogéneo (Ver Fig. 8).

En cuanto al tamaño, las partículas CCHEN que más se asemejaron a las de Bio-Oss fueron las de 0.3 – 0.5 mm, siendo los otros tamaños visiblemente más grandes que el control el análisis estadístico mostró diferencias significativas tanto en el ancho como en el largo (Wilcoxon, Sign Test $p = 0.0005$; $p = 0.0213$ respectivamente). El área aproximada de las partículas CCHEN fue de 0.5 mm^2 y la de Bio-Oss de 0.69 mm^2 encontrándose también diferencias estadísticamente significativas (Wilcoxon, $p = 0.0105$).

La densidad de partículas para un espacio dado, encontrada en Bio-Oss fue muy superior a la del hueso nacional, siendo la de este último de 2.85 gr/ml y la de Bio-Oss de 5.7 gr/ml (Ver Tabla 5).

Tabla 5
Comparación de Promedios de tamaño y densidad entre las partículas CCHEN y Bio-Oss

	Ancho mm	Largo mm	Superficie mm²	Densidad
Partículas CCHEN (0.3 – 1 mm)	0.54	0.81	0.50	2.85 gr/ml
Partícula de Bio-Oss	0.68	0.98	0.69	5.7 gr/ml

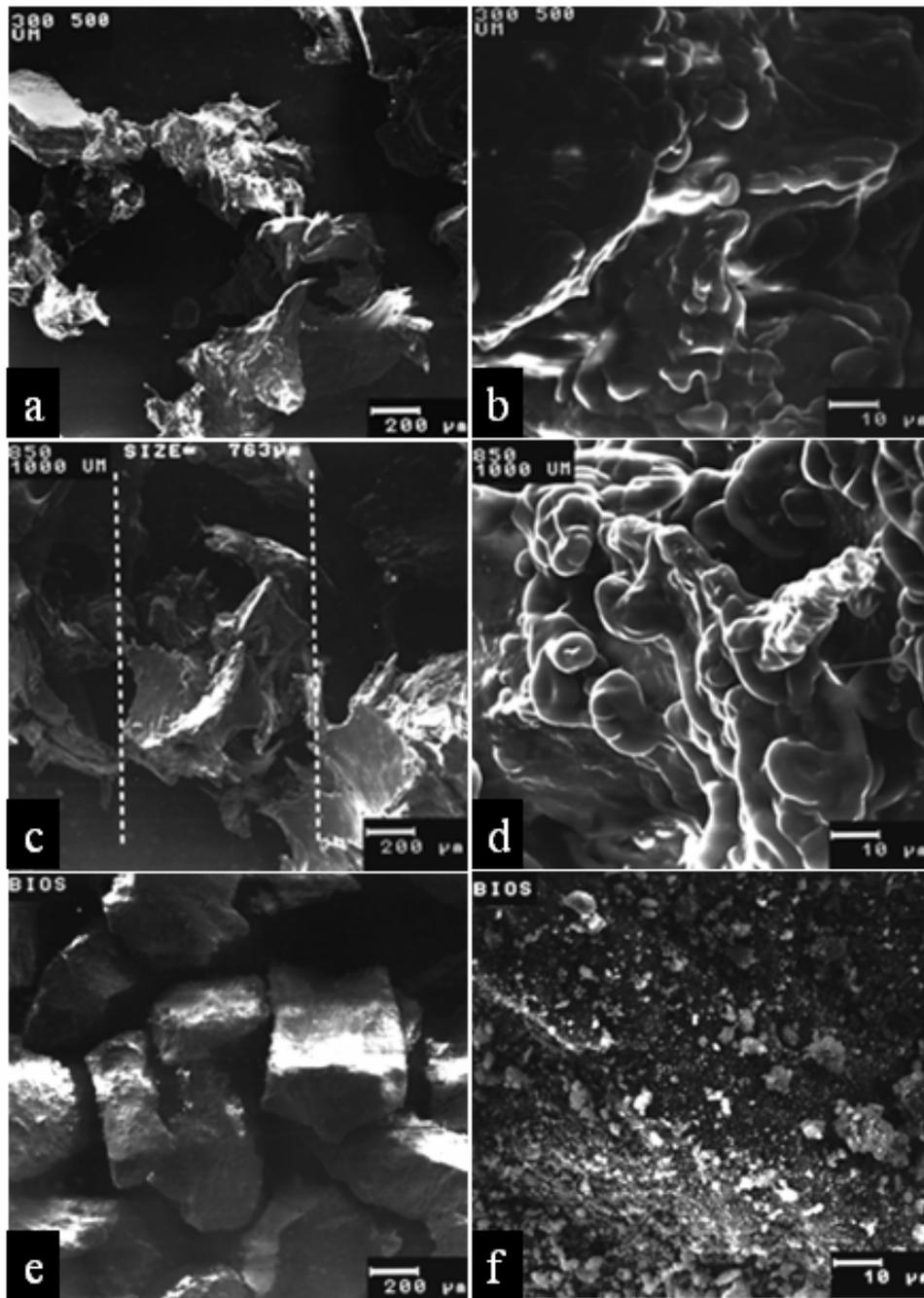


Figura 8: Microfotografías de las partículas de hueso CCHEN y de Bio-Oss vistas a través de M.E.B 50x y 1000x. A) Hueso CCHEN 0.3 – 0.5 mm 50x, B) Hueso CCHEN 0.3 – 0.5 mm 1000x, C) Hueso CCHEN 0.85 – 1 mm 50x, D) Hueso CCHEN 0.85 – 1 mm 1000x, E) Hueso Bio-Oss 50x, F) Hueso Bio-Oss 1000x.

DISCUSIÓN

El presente estudio realizó un análisis comparativo de la morfología, tamaño y densidad de las partículas de hueso elaborado por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) y Bio-Oss mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido, ampliamente usada en el análisis de las características superficiales de los materiales cristalinos (47). El análisis morfológico mostró que el granulado nacional CCHEN presenta formas bastante irregulares, superficie rugosa y tamaños variables, a diferencia de la homogeneidad observada en Bio-Oss cuyas partículas presentaron un tamaño homogéneo, una superficie mas bien lisa y una geometría regular, tendiendo a una forma cúbica. Las medias de los tamaños por cada grupo de muestra, son significativamente diferentes entre Bio-Oss y las muestras CCHEN comparables. Esto implica que el hueso CCHEN presenta un tamaño de partícula bastante menos homogéneo que el BioOss, esto puede deberse a diferencias en el proceso de preparación de cada granulado. Los trozos de hueso en CCHEN son raspados por limas que pueden dar virutas de tamaño variable y principalmente al ser tamizadas, aun cuando se usen tamices de tamaño estándar, la partícula puede tener una dimensión homogénea pero no dos, obteniendo partículas mas alargadas con forma irregular. No así Bio-Oss en que aparentemente al momento del limado ya las partículas son redondeadas, ellas parecen ser talladas por el tamiz pues ellas presentan todas prácticamente las mismas formas.

Además de las diferencias entre la forma y el tamaño de las partículas, la comparación macroscópica de los granulados relevó ciertas diferencias cromáticas donde el hueso CCHEN presentaba un color más amarillento en comparación al tono más blanco presentado por Bio-Oss. Ciertos estudios han mostrado que el tratamiento esterilizador por rayos gamma

puede inducir cambios en la apariencia física de los materiales, es así como el vidrio luego de ser esterilizado con radiación gamma cambia a un tono café oscuro (51).

Debido a las diferencias de forma de las partículas que fue mencionada anteriormente, se encontró que la densidad de ambos huesos (CCHEN y Bio-Oss), en términos de espacio ocupado, era francamente distinta, siendo la de Bio-Oss 5.7 gr/ml y la de CCHEN de 2.85 gr/ml. Esto puede ser atribuido principalmente al mayor ordenamiento de las partículas de Bio-Oss al tener formas mas regulares, no siendo tan importante la porosidad propia de cada partícula. La forma macroscópica del material influye esencialmente en el tamaño del interparticulado, más precisamente del espacio intergranular, es así que ciertos trabajos han mostrado que la geometría de las partículas de formas irregulares generan espacios interparticulares mas grandes que materiales con formas regulares, cúbicas u ovals (46) Estos estudios se han referido a esta irregularidad superficial en la forma de las partículas como macroporos, demostrando la influencia positiva de esta irregularidad sobre la osteoconductividad de los materiales para regeneración ósea (47). Esto aparentemente tendría validez analógica para la formación de espacios intergranulares. La regeneración ósea debiera ser mejor mientras mayor sea el espacio intergranular, siendo esto válido solamente en la medida que se pueda mantener el espacio del granulado el tiempo suficiente.

Teniendo en cuenta que el hueso CCHEN no presenta el proceso de ceramización que recibe Bio-Oss (46) el cual aumenta el tiempo de reabsorción de las partículas hasta 4 años, suponemos que el particulado nacional tendrá un tiempo de reabsorción ostensiblemente menor que el control, análisis de biodegradación *in vivo* deberían ser realizados. Esta menor duración podría explicarse con lo reportado por Weibrich G et col., 2000 en cuyo estudio se habla de la influencia de la rugosidad superficial de las partículas en el tiempo que le toma al organismo reabsorverlas. Siendo así más rápida la degradación de gránulos altamente porosos,

debido a la mayor superficie de contacto entre la partícula y el medio circundante. Esto último reafirma la hipótesis de que las partículas CCHEN, altamente rugosas, tendrían una tasa de reabsorción mayor, es decir desaparecerían del seno tisular en menor tiempo que las partículas de Bio-Oss que son de una superficie más lisa, estudios en animales son necesarios para determinar esta cinética.

Si bien los resultados obtenidos en este estudio no permiten corroborar la hipótesis de trabajo, debido a que el hueso de la Comisión Chilena de Energía Nuclear presentó características morfológicas y ultraestructurales muy diferentes al Bio-Oss. Esto debería tomarse en cuenta en su aplicación clínica donde ya ha sido comprobado por varios autores que la mayor porosidad es favorable para la osteoconducción, siendo esperable entonces que un mayor espacio intergranular también la favorezca. Se ha asociado también la forma de las partículas con la ocurrencia de infecciones (52) siendo los gránulos de forma irregular y superficie rugosa más aptos para la colonización bacteriana, y por el contrario las partículas de formas más regulares y superficie más lisa ofrecerían un ambiente más hostil para la colonización y desarrollo bacteriano. Más estudios deben ser realizados para analizar la tasa de reabsorción y el verdadero comportamiento clínico de los diferentes particulados preparados por la CCHEN, para lo cual se recomienda un estudio en animales.

CONCLUSIONES

- El análisis ultraestructural con MEB demostró diferencias significativas entre el granulado CCHEN y Bio-Oss, a bajo aumento se evidenciaron diferencias en la forma de cada partícula y a mayores aumentos se observaron diferencias en la porosidad de la partícula y en la rugosidad de su superficie.
- Bio-Oss se observó más liso y menos poroso a diferencia del granulado CCHEN el cual es muy rugoso y poroso
- La observación macroscópica y el análisis volumétrico de ambos grupos mostraron diferencias en la forma del particulado, donde CCHEN presentó los gránulos más irregulares y produjo mayores espacios intergranulares.

RESUMEN

La forma y morfología superficial de los materiales de injerto óseo granulados influyen en sus propiedades como material de reemplazo del hueso perdido. En Chile la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) ha desarrollado un hueso. El objetivo de este trabajo es analizar la morfología de este hueso CCHEN y compararlo con un xenoinjerto comercial de uso internacional (Bio-Oss®). Para esto se analizó la densidad y se examinó la forma y morfología superficial de ambos materiales en microscopia electrónica de barrido.

Las partículas del hueso de CCHEN en sus diferentes tamaños (0.3 - 0.5mm, 0.85 - 1mm, > 1mm) presentaron formas irregulares, con cantidad variable de aristas agudas y tamaños heterogéneos, y una morfología superficial rugosa. El Bio-Oss por el contrario presentó partículas de forma cúbica, de aristas redondeadas con una morfología superficial más homogénea que las partículas CCHEN. Mayores aumentos permitieron corroborar la irregularidad de la superficie del hueso CCHEN (macroporos) en cambio Bio-Oss mostró un microparticulado expandido en su superficie mostrando una rugosidad muy escasa.

La forma del granulado, así como la presencia de macroporos, influyen significativamente en el tamaño del espacio interparticular. Estos son factores relevantes para las características osteoconductoras de los materiales de reemplazo óseo. El hueso CCHEN por sus características irregulares y su alto porcentaje de macroporos sería recomendable para el reemplazo de defectos óseos más grandes, y no estaría indicado, aún cuando se trate de partículas del tamaño inferior, para áreas propensas a infección como el área periodontal.

Palabras claves: Regeneración ósea, injertos, hueso desproteínizado, Bio-Oss

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. La enfermedad de la vaca loca. Situación actual en Chile. Revista Occidente. La Sociedad. Las ideas. El futuro. ISSN 0716-2782 - Año LVI Enero - Marzo 2001 <http://www.revistaoccidente.cl/376/noticias/vacaslocas/stiactuachile.act>
2. Bianchi Andrea. Prótesis Implantosoportada, 1° Edición, 2001
3. Gehron Robey P, Fedarko NS et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993;8:483-7
4. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res* 1997;48:50-9.
5. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35
6. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-55.
7. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
8. Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 19-30.
9. Heersche JNM. Mesenchymal stem cells and their involvement in bone remodeling, repair, and regeneration. En: Zarb G, Leckholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H eds. *Aging, Osteoporosis, and Dental Implants*. Carol Stream: Quintessence Publishing Co.; 2002. p. 17-23.
10. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-64.
11. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblasts differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
12. Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in *Cbfa1*-deficient mice. *Bone* 1999;25:639-51.
13. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 143-51.
14. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993;91:1888-96.
15. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
16. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67.

17. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int* 1993;53:102-7.
18. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993;8:505-10.
19. Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527-38.
20. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
21. Buser D. Ruskin J. Higginbottom F. Hardwick R. Dahlin C. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrana-protected defect: a histologic study in the canine mandible. *J Int Oral Maxillofac Impl.*1995:10;666-681
22. Lacroix P. Organizers and growth of bone. *J Bone Joint Surg* 1947; 29: 292.
23. Friedenstein A. Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: Elliott K, Fitzsimmons D (eds). *Hard Tissue Growth, Repair, and Remineralization*; Ciba Foundation Symposium 1973; 11: 169-185
24. Smukler H. Barboza E.P Burliss C A new approach to regeneration of surgically reduced alveolar ridges in dog: a clinical and histologic study. *J Int Oral Maxillofac Impl.* 1995:10;537-550
25. Kahnberg K-E. Nystrom E. Bartholdsson L. Combined use of bone graft and branemark mixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *J Int Oral Maxillofac Impl.*1989:4;297-304
26. *Guide Bone Regeneration in Implant Dentistry.* Buser D., Dahlin C. Quintessence Publishing. Co, Inc 1994 Hong Kong
27. Wolf L. New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration. *International dental journal* 50 2000Pag 235-244
28. Wang L. Guided Tissue regeneration – based root coverage utilizing collagen membranes : Technique and case reports *quintessence Int* volume 33 2002: 10 :715 - 721
29. Chiapasco M, Romeo E. “Rehabilitación Implantosoportada en casos complejos” Editorial Amolda Edicion Año 2006
30. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the sinus floor with particulated mandible: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:760-6.
31. Keller E, Eckert S, Talman D. Maxillary antral and nasal inlay autogenous bone graft reconstruction of compromised maxilla: A 12 year retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:707-21.

32. Keller E, Eckert S, Talman D. Maxillary antral and nasal one-stage inlay composite bone graft: Preliminary report on 30 recipient sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:438-48.
33. Jensen O, Greer O. Immediate placement of osseointegrated implants into the maxillary sinus augmented with mineralized cancellous allograft and gore-tex: second-stage surgical and histological findings. En Lane W. Talman D. Eds: *Tissue integration in oral orthopedic and maxillofac reconstruction*. Chicago: Quintessence 1992:321-33.
34. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodont Res Dent* 1997;17:233-41.
35. Machin A. "Ciencia y Técnica en Implantología Inmediata Tomo 2" 2007 Editorial Medica Ripano Madrid España.
36. Carmagnola D, Berglundh T, Lindhe J : The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 377-383.
37. Piatelli M, Favero G. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: A histologic long-term report of 20 cases in human. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999: 14 (6), 835-840
38. Artzi Z, Tal H. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*, June 2000, 1015-1023
39. Artzi Z, NemCovsky C. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite bone derivatives in sinus augmentation procedures: A comparative study in humans. *J Periodontol*, July 2001, 911-920
40. Valentini P, Densari D. Histological evaluation of Bio Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. *Clin Oral Impl Res* 1998: 9: 59-64
41. Zitzmann N, Schärer P. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: A histologic Study in humans. *Int J Periodont Res Dent*, Volume 21, Number 3, 2001, 289-295
42. Norton R. Odell E. Efficacy of bovine bonemineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Impl Res* 2003: 14,775-783
43. Schwartz Z, Weesner T. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *Journal of Periodontology* 2000: 71: 1258-1269
44. Taylor J, Cuff S. In Vitro osteoclast resorption substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*: 2002:17: 321-330
45. Açil Y, Terheyden H. Three-dimesional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research*: 2000: 51: 703-710
46. Benke D, Olah A. Protein-chemical análisis of Bio-Oss bone substitute and evidence of its carbonate content. *Biomaterials*: 2001: 22:1005-1012

47. Weibrich G, Götz H, Gnoth S-H, Trettin R, Duschner H, Wagner W. Charakterisierung der Oberflächenmorphologie von Knochenersatzmaterialien mittels REM. Z Zahnärztl Implantol : 2000; 16: 151-159
48. <http://www.geistlich.com/index.cfm?dom=2&rub=47>
49. <http://www.geistlich.com/index.cfm?dom=2&rub=45>
50. http://es.wikipedia.org/wiki/Profundidad_de_color
51. "Radiactividad," Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2007. <http://mx.encarta.msn.com> © 1997-2007 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
52. Delgado Blanca, González Óscar, Sánchez José, Villalpando Mónica Albores Dorian. Cierre quirúrgico de fistulas oroantrales Rev Med IMSS 2005; 43 (2): 167-172 (Mexico)

ANEXOS

Medidas de ancho, largo y área del particulado de la CCHEN y Bio-Oss observadas bajo microscopio electrónico de barrido

Partículas 0,30- 0,5 mm		
Ancho	Largo	Area mm2
0,36	0,51	0,18
0,74	0,88	0,65
0,42	0,60	0,25
0,41	0,58	0,24
0,36	0,56	0,20
0,47	0,56	0,26
0,35	0,52	0,18
0,31	0,70	0,22
0,26	0,51	0,13
0,41	0,78	0,32
0,42	0,61	0,26
0,32	0,51	0,16
0,40	0,53	0,21
0,44	0,60	0,26
0,34	0,54	0,18
0,44	0,31	0,14
0,40	0,58	0,24
DS		0,12
Min		0,13
Max		0,65

Partículas 0.85 – 1.0 mm		
Ancho	Largo	Area mm2
0,76	1,04	0,79
0,55	0,75	0,41
0,77	1,29	0,99
0,77	1,45	1,12
0,57	0,72	0,41
0,79	1,26	1,00
0,57	0,68	0,39
0,65	0,89	0,58
0,49	0,92	0,45
0,44	0,74	0,33
0,56	0,69	0,39
0,52	1,31	0,68
0,81	1,43	1,16
1,49	1,66	2,47
0,47	1,03	0,48
0,49	0,80	0,39
0,67	1,04	0,75
DS		0,54
Min		0,33
Max		2,47

Partículas Bio Oss		
Ancho	Largo	Area mm2
0,84	0,85	0,71
0,62	0,77	0,48
0,85	1,58	1,34
0,66	0,82	0,54
0,93	1,38	1,28
0,83	1,21	1,00
0,43	0,57	0,25
0,56	0,68	0,38
0,69	1,10	0,76
0,83	1,18	0,98
0,60	0,95	0,57
0,58	1,10	0,64
0,58	0,85	0,49
0,50	0,57	0,29
0,46	0,94	0,43
0,84	1,05	0,88
0,68	0,98	0,69
DS		0,33
Min		0,25
Max		1,34

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS INTERACTIVAS

- 1 La enfermedad de la vaca loca. Situación actual en Chile. Revista Occidente. La Sociedad. Las ideas. El futuro. ISSN 0716-2782 - Año LVI Enero - Marzo 2001 <http://www.revistaoccidente.cl/376/noticias/vacaslocas/stiactuachile.act>
- 2 Bianchi Andrea. Prótesis Implantosoportada, 1º Edición, 2001)
- 3 Gehron Robey P, Fedarko NS et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993;8:483-7
- 4 Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res* 1997;48:50-9.
- 5 Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35
- 6 Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-55.
- 7 Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
- 8 Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 19-30.
- 9 Heersche JNM. Mesenchymal stem cells and their involvement in bone remodeling, repair, and regeneration. En: Zarb G, Leckholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H eds. *Aging, Osteoporosis, and Dental Implants*. Carol Stream: Quintessence Publishing Co.; 2002. p. 17-23.
- 10 Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-64.
- 11 Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblasts differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
- 12 Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in *Cbfa1*-deficient mice. *Bone* 1999;25:639-51.
- 13 Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 143-51.
- 14 Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. *Conexin 43* mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993;91:1888-96.

-
- 15 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
 - 16 Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67.
 - 17 Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int* 1993;53:102-7.
 - 18 Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993;8:505-10.
 - 19 Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527-38.
 - 20 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burguess TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
 - 21 Buser D, Ruskin J, Higginbottom F, Hardwick R, Dahlin C. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrana-protected defect: a histologic study in the canine mandible. *J Int Oral Maxillofac Impl.*1995;10;666-681
 - 22 Lacroix P. Organizers and growth of bone. *J Bone Joint Surg* 1947; 29: 292.
 - 23 Friedenstein A. Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: Elliott K, Fitzsimmons D (eds). *Hard Tissue Growth, Repair, and Remineralization*; Ciba Foundation Symposium 1973; 11: 169-185
 - 24 Smukler H, Barboza E.P, Burliss C A new approach to regeneration of surgically reduced alveolar ridges in dog: a clinical and histologic study. *J Int Oral Maxillofac Impl.* 1995;10;537-550
 - 25 Kahnberg K-E, Nystrom E, Bartholdsson L. Combined use of bone graft and biomaterial mixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *J Int Oral Maxillofac Impl.*1989;4;297-304
 - 26 *Guide Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Buser D., Dahlin C. Quintessence Publishing. Co, Inc 1994 Hong Kong
 - 27 Wolf L. New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration. *International dental journal* 50 2000;Pag 235-244
 - 28 Wang L. Guided Tissue regeneration – based root coverage utilizing collagen membranes : Technique and case reports *quintessence Int* volume 33 2002: 10 :715 - 721
 - 29 Chiapasco M, Romeo E. “Rehabilitación Implantosoportada en casos complejos” Editorial Amolda Edición Año 2006
 - 30 Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the sinus floor with particulated mandible: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:760-6.

-
- 31 Keller E, Eckert S, Talman D. Maxillary antral and nasal inlay autogenous bone graft reconstruction of compromised maxilla: A 12 year retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:707-21.
 - 32 Keller E, Eckert S, Talman D. Maxillary antral and nasal one-stage inlay composite bone graft: Preliminary report on 30 recipient sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:438-48.
 - 33 Jensen O, Greer O. Immediate placement of osseointegrated implants into the maxillary sinus augmented with mineralized cancellous allograft and gore-tex: second-stage surgical and histological findings. En Lane W, Talman D. Eds: *Tissue integration in oral orthopedic and maxillofac reconstruction*. Chicago: Quintessence 1992:321-33.
 - 34 Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodont Res Dent* 1997;17:233-41.
 - 35 Machin A. "Ciencia y Técnica en Implantología Inmediata Tomo 2" 2007 Editorial Medica Ripano Madrid España.
 - 36 Carmagnola D, Berglundh T, Lindhe J : The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 377-383.
 - 37 Piatelli M, Favero G. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: A histologic long-term report of 20 cases in human. *Int J Oral Maxillofac Implants*, Volume 14, Number 6, 1999, 835-840
 - 38 Artzi Z, Tal H. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*, June 2000, 1015-1023
 - 39 Artzi Z, NemCovsky C. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite bone derivatives in sinus augmentation procedures: A comparative study in humans. *J Periodontol*, July 2001, 911-920
 - 40 Valentini P, Densari D. Histological evaluation of Bio Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. *Clin Oral Impl Res* 1998; 9: 59-64
 - 41 Zitzmann N, Schärer P. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: A histologic Study in humans. *Int J Periodont Res Dent*, Volume 21, Number 3, 2001, 289-295
 - 42 Norton R, Odell E. Efficacy of bovine bonemineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Impl Res* 14, 2003, 775-783
 - 43 Schwartz Z, Weesner T. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *Journal of Periodontology* 2000; 71: 1258-1269
 - 44 Taylor J, Cuff S. In Vitro osteoclast resorption substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*: 2002;17: 321-330
 - 45 Açil Y, Terheyden H. Three-dimesional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research*: 2000: 51: 703-710

-
- 46 Benke D, Olah A. Protein-chemical análisis of Bio-Oss bone substitute and evidence of its carbonate content. *Biomaterials*: 2001; 22:1005-1012
- 47 Weibrich G, Götz H, Gnoth S-H, Trettin R, Duschner H, Wagner W. Charakterisierung der Oberflächenmorphologie von Knochenersatzmaterialien mittels REM. *Z Zahnärztl Implantol* : 2000; 16: 151-159
- 48 <http://www.geistlich.com/index.cfm?dom=2&rub=47>
- 49 <http://www.geistlich.com/index.cfm?dom=2&rub=45>
- 50 http://es.wikipedia.org/wiki/Profundidad_de_color
- 51 "Radiactividad," Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2007. <http://mx.encarta.msn.com> © 1997-2007 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
- 52 Delgado Blanca, González Óscar, Sánchez José, Villalpando Mónica Albores Dorian. Cierre quirúrgico de fístulas oroantrales *Rev Med IMSS* 2005; 43 (2): 167-172 (Mexico)